

## System for contamination-free reaction processes.

**Patent number:** DE4412286  
**Publication date:** 1995-10-12  
**Inventor:** BIENHAUS GERHARD DR RER NAT (DE); LANGE HANS (DE)  
**Applicant:** BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (DE)  
**Classification:**  
 - international: B01L3/00; G01N35/00; G01N33/53; C12Q1/00; C12Q1/68  
 - european: B01L3/14C; G01N35/00R  
**Application number:** DE19944412286 19940409  
**Priority number(s):** DE19944412286 19940409

Also published as

EP067664  
 JP728701!  
 EP067664  
 EP067664

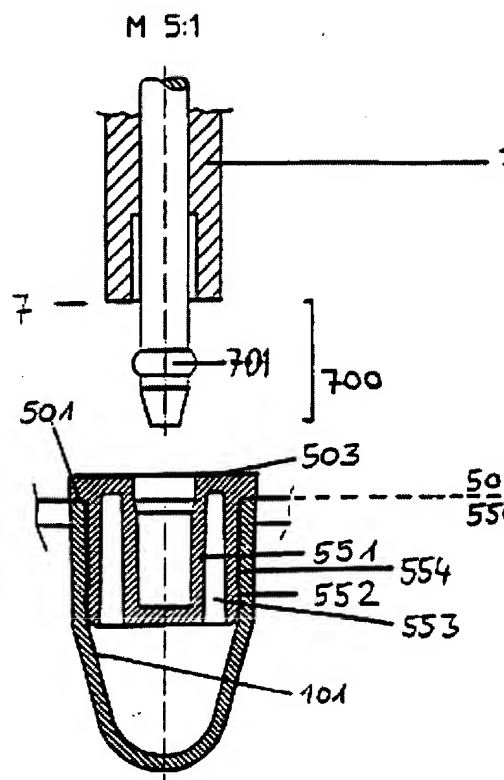
Abstract not available for DE4412286

Abstract of correspondent: **EP0676643**

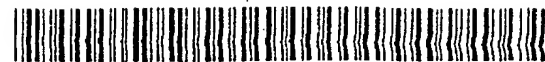
A system for carrying out a reaction automatically has a number of reaction vessels, a number of vessels for the supply of reagents, a number of vessels for samples; several closures for the vessels; and an appts. that automatically opens the separate closures.

Also claimed is an appts. with a system to pipette the liquids and a system to remove and/or attach the closures at the vessels.

FIG 2







①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 44 12 286 A 1**

⑤1 Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**B 01 L 3/00**  
G 01 N 35/00  
G 01 N 33/53  
C 12 Q 1/00  
C 12 Q 1/68

②1 Aktenzeichen: P 44 12 286.1  
②2 Anmeldetag: 9. 4. 94  
④3 Offenlegungstag: 12. 10. 95

14  
K 45571

DE 44 12 286 A 1

⑦1 Anmelder:  
Boehringer Mannheim GmbH, 68305 Mannheim, DE

⑦2 Erfinder:  
Bienhaus, Gerhard, Dr.rer.nat., 82407 Wielenbach,  
DE; Lange, Hans, 68623 Lampertheim, DE

⑤4 System zur kontaminationsfreien Bearbeitung von Reaktionsabläufen

⑤7 System zur automatischen Durchführung von Reaktionen unter Verwendung von mehreren Gefäßen, die durch Einzelverschlüsse verschlossen werden können, wobei eine Vorrichtung zum automatischen Öffnen der Verschlüsse vorgesehen ist.

DE 44 12 286 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 08. 95 508 041/276

14/31

Gegenstand der Erfindung ist ein System zur automatischen Durchführung von Reaktionen in Reaktionsgefäßen sowie geeignete Reaktionsgefäße und Verschlüsse.

Ein wesentlicher Baustein von Gesundheitssystemen ist der Nachweis von Erkrankungen über die sogenannte medizinische Diagnostik. Dabei werden mit Proben, die eventuell krankheitsbefallenen Personen entnommen wurden, Nachweisreaktionen auf bestimmte Analyten durchgeführt. Als geeignete Analyten haben sich Substrate von Enzymreaktionen, Enzyme selbst, Antigene und in neuerer Zeit auch Nukleinsäuren erwiesen. Dabei ist die Analyse der letztgenannten Substanzen oft deutlich erschwert, da die vorliegenden Konzentrationen manchmal sehr gering sind. Eine Voraussetzung für verlässliche Ergebnisse ist ein verschleppungsfreies Arbeiten, da geringste Konzentrationen von Störsubstanzen einen wesentlichen Einfluß auf das Meßergebnis haben. Insbesondere bei Tests, bei denen mehrere Analysen nacheinander in einem Gerät durchgeführt werden, besteht eine erhebliche Verschleppungsgefahr.

Bei der Nukleinsäurediagnostik wurde durch die Zurverfügungstellung von Amplifikationsverfahren, wie beispielsweise der Polymerase Chain Reaction (US-A-4,683,195) die Nachweisgrenze deutlich reduziert. Dafür steigt jedoch auch die Gefahr der Verfälschung des Meßergebnisses durch Kontaminationen, vor allen Dingen durch Aerosolbildung in der Luft. Aus diesem Grund wurde auch vorgeschlagen, die Vorbereitung von zu analysierenden Proben und die Amplifikation in getrennten Räumen vorzunehmen. Weitere Lösungsansätze sind Übersichten mit Öl oder Wachs sowie die Anwendung eines internen enzymatischen Dekontaminationssystems mit geringerer Sensitivität (US-A-5,035,996). Diese Lösungen sind jedoch aufwendig und für eine automatische Durchführung mehrerer Reaktionen schlecht geeignet.

Bei der Polymerase Chain Reaction werden spezielle Röhrchen verwendet, die durch konische Ausformung einen guten Wärmeübergang von einer untenliegenden Heizung ermöglichen. Darüber hinaus benutzen die meisten zur Durchführung der Thermozyklen verwendeten Geräte eine Deckelheizung (ca. 100°C) zur Reduzierung der Verdunstung und zur Vermeidung von Kondensatbildung.

Ebenfalls beschrieben sind Platten, die mehrere Reaktionsgefäße enthalten, die über einen manuell aufreißbaren gemeinsamen Deckel verschlossen werden können. Ein Nachteil dieser Ausführung ist, daß bei der Öffnung der Platte Spritzer von einem Reaktionsgefäß in ein benachbartes gelangen können und somit die Verschleppungsgefahr verstärkt ist.

In EP-A-0 408 280 werden auch Reaktionsgefäße im offenen 96 well-Mikrotitrationsplattenformat beschrieben. Die Kontaminationsgefahr ist hier ebenfalls sehr groß.

Alle bisher beschriebenen Lösungsansätze für Gefäße zur automatischen Abarbeitung von mehreren Reaktionen haben den Nachteil, daß die Reaktionsgefäße entweder nicht effektiv verschließbar sind, oder daß die Reaktionsgefäße Verschußkappen haben, die nicht automatengängig sind. Diese Systeme sind daher für eine Routineanwendung mit hohem Durchsatz nur mit erheblichem Kontaminationsrisiko zu gebrauchen.

Gegenstand der Erfindung ist ein System zur automatischen Durchführung von Reaktionen in Reaktionsge-

- mehrere Reaktionsgefäße,
- mehrere Einzelverschlüsse für diese Reaktionsgefäße,
- eine Vorrichtung zum automatischen Öffnen der Verschlüsse und
- eine automatische Pipettiereinrichtung.

In gleicher Weise sind mit der oben genannten Technologie Proben- und Reagenzvorratsgefäße zu bedienen.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung sind geeignete Reaktionsgefäße und Verschlüsse für solche Systeme.

Das erfindungsgemäße System ist zur automatischen Durchführung von Reaktionen geeignet. Als automatisch wird in diesem Zusammenhang eine Durchführung bezeichnet, bei der manuelle Arbeitsschritte nach Einführung der Probe in das System bis zum Erhalt des Meßergebnisses vermieden werden. Die Bearbeitungsschritte laufen in vorbestimmter Weise, vorzugsweise getrennt durch ein Computerprogramm, im System ab. Das System ist außerdem zur Durchführung mehrerer aufeinanderfolgender Reaktionen, und sogar in verschiedenen Reagenzvorratsgefäßen, geeignet.

Prinzipiell kann jede Art von chemischen Reaktionen im erfindungsgemäßen System durchgeführt werden. Dazu gehören insbesondere Verfahren, die im Laufe einer Analyse von Bestandteilen einer Probe zu durchlaufen sind. Die vorkommenden Reaktionen richten sich nach der Art des zu bestimmenden Analyten. So werden beispielsweise immunologisch aktive Verbindungen üblicherweise über immunologische Nachweisverfahren bestimmt. Dabei wird die Wechselwirkung zwischen Antigenen und Haptenen einerseits und dagegen gerichteten Antikörpern andererseits genutzt. Im Falle von Nukleinsäurenachweisen wird die relativ spezifische Wechselwirkung zwischen zueinander im wesentlichen komplementären Nukleinsäuren verwendet.

Analyseverfahren für Nukleinsäuren lassen sich im wesentlichen in die Schritte Probenvorbereitung, Nukleinsäurebearbeitung und Nachweis der behandelten Nukleinsäuren einteilen. Das erfindungsgemäße System ist zur Durchführung insbesondere der Nukleinsäurebehandlungsreaktionen ausgelegt. Zu diesen Reaktionen gehört insbesondere die Amplifikation der Nukleinsäuren. Hierfür existieren eine Reihe von Möglichkeiten. Während es isotherm geführte Amplifikationen, wie das in EP-A 0 329 822 beschriebene Verfahren gibt, werden viele andere Amplifikationen unter Durchführung von Temperaturänderungszyklen (Thermozyklen) geführt, wie beispielsweise in der EP-A-0 200 362 beschrieben.

Das erfindungsgemäße System enthält mehrere Reaktionsgefäße, die zur Aufnahme von Reaktionsflüssigkeiten geeignet sind. Das Volumen der Reaktionsflüssigkeiten liegt bevorzugt bei 5 µl bis 5 ml, besonders bevorzugt zwischen 10 µl und 200 µl. Die Reaktionsgefäße sind aus einem gegenüber der Reaktionslösung inerten Material z. B. Kunststoffen wie Polystyrol oder Polypropylen, gefertigt. Sofern die Durchführung von Thermozyklen vorgesehen wird, müssen diese Reaktionsgefäße auch thermostabil sein. Die üblicherweise verwendeten PCR-Tubes von Perkin Elmer sind beispielsweise als Reaktionsgefäße der vorliegenden Erfindung gut geeignet.

Ein wesentliches Merkmal der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von Einzelverschlüssen für diese Reaktionsgefäße. Der Einzelverschluß von Reak-

tionsgefäßen wurde bisher nicht in Betracht gezogen, möglicherweise dadurch unterstützt, daß die Konstrukturen von Tube-Verbund-Platten auf die Verwendung von Verbunddeckeln als besonders geeignet fixiert waren. Darüber hinaus stellt die Verwendung von Einzelverschlüssen eine technische Herausforderung dar, die durch die erfindungsgemäßen Einzelverschlüsse bewältigt wird.

Reaktionen, die in dem Reaktionsgefäß durchgeführt werden können, können physikalischer Art (z. B. Adsorptionen), aber auch biochemischer Art (z. B. Enzymreaktionen, Amplifikationen etc.) sein.

Ebenfalls wesentlich für das erfindungsgemäße System ist eine Vorrichtung zum automatischen Öffnen der Verschlüsse. Diese Vorrichtung ist technisch auf den jeweils verwendeten Einzelverschluß ausgerichtet.

Zur automatischen Durchführung der Reaktionen werden Flüssigkeiten in das Reaktionsgefäß gefüllt werden. Hierzu hat sich die Verwendung einer automatischen Pipettiereinrichtung, bevorzugt mit Wegwerfspitzen, als besonders vorteilhaft herausgestellt. Dabei können die Komponenten der durchzuführenden Reaktionen in beliebiger geeigneter Reihenfolge pipettiert werden. Es ist beispielsweise möglich, zunächst eine den Analyten enthaltende Probenflüssigkeit in das Reagenzvorratsgefäß zu bringen. Dies kann gewünschtenfalls schon außerhalb des erfindungsgemäßen Systems und ohne die automatische Pipettiereinrichtung geschehen. In einem nachfolgenden Schritt, der gewünschtenfalls mittels der automatischen Pipettiereinrichtung vorgenommen werden kann, werden die für die Reaktion erforderlichen Reagenzien zu der Probenflüssigkeit im Reagenzvorratsgefäß gegeben, wobei das erfindungsgemäße Verfahren ebenfalls Anwendung finden kann.

In einer anderen Ausführungsform sind die erforderlichen Reagenzien in fester oder flüssiger Form im Reaktionsgefäß vorgegeben, und die Probenflüssigkeit wird dazupipettiert.

Im folgenden wird ein System zur automatischen Durchführung von Reaktionen in einer Verbundplatte mit 96 Wells im Mikrotitrationsplattenraster beschrieben, wobei dies eine besonders bevorzugte Ausführungsform der Anordnung mehrerer Reaktionsgefäße ist. Dieses System eignet sich besonders gut für die Durchführung der Polymerase Chain Reaction unter Durchführung von Thermozyklen. In Fig. 1 ist eine Verbundplatte für das Gerät Perkin Elmer Cycler 9600 angedeutet. Ein Reaktionsgefäß 1 ist als in einem der Löcher 3 einer Halteplatte 2 für 96 Tubes befindlich gezeichnet. Das Reaktionsgefäß ist durch Widerhaken 102 in der Halteplatte fixiert. Sobald die Verbundplatte mit den Reaktionsgefäßen in den PCR-Cycler eingelegt wird, reichen die Spitzen der Reaktionsgefäße in den Thermoblock 4 des Cyclers hinein. In dieser Figur ist schematisch ein für die Erfindung geeigneter Deckel 5 eingezeichnet. Zum Verschluß des Reaktionsgefäßes wird der Deckel 5 in das Reaktionsgefäß 1 bis zu einem Anschlag 501 hineingedrückt.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Deckel für ein Reaktionsgefäß, welcher einen in die Öffnung des Reaktionsgefäßes hineinragenden Teil aufweist, dadurch gekennzeichnet, daß dieser Teil Mittel zur Entfernung des Deckels aus dem Reaktionsgefäß beinhaltet.

Der erfindungsgemäße Deckel weist mindestens zwei Teile auf. Einer der Teile (Bezugszahl 550) ist so gestaltet, daß er in die Öffnung des zugehörigen Reaktionsgefäßes hineinragt, wenn das Reaktionsgefäß durch den Deckel verschlossen ist. Ein anderer Teil 500 ragt dann

noch aus dem Reaktionsgefäß hinaus.

Der Teil 550 enthält Mittel 551 zur Entfernung des Deckels von dem Reaktionsgefäß. Außerdem kann dieser Teil Mittel zur Abdichtung des Deckels gegenüber dem Reaktionsgefäß aufweisen, z. B. Dichtlippen oder Dichtwülste 552.

Der Teil 500 enthält bevorzugt einen Anschlag 501, der verhindert, daß der Deckel in beim Verschließen des Reaktionsgefäßes vollständig in diesem verschwindet. Dadurch wird auch eine exakte Orientierung der Deckeloberfläche 503 gewährleistet. Der Teil 500 des Deckels ragt bevorzugt nur sehr wenig über die Öffnung des Reaktionsgefäßes hinaus. Die aus dem Reaktionsgefäß herausragenden Teile des Deckels schließen im wesentlichen mit einer Oberfläche 503 ab. Dies ist von Vorteil, wenn eine Deckelheizung zur Vermeidung der Kondensation von Wasserdampf aus der Reaktionsflüssigkeit am Deckel verwendet werden soll. Diese kann dann plan auf den Oberflächen 503 mehrerer Reaktionsgefäße aufliegen.

Als Mittel 551 zur Entfernung des Deckels können alle konstruktiven Ausführungen dienen, die bewirken, daß der Widerstand zwischen der Vorrichtung zum automatischen Entfernen des Deckels und dem Deckel größer ist als der Widerstand zwischen dem Deckel und der Innenwand des Reaktionsgefäßes. Technische Ausführungsmöglichkeiten bieten sich beispielsweise durch Einsatz konischer Flächen oder Wülste zum Einrasten einer Vorrichtung im Teil 550.

In Fig. 2 ist eine erste Ausführungsform für einen erfindungsgemäßen Deckel (im Zustand eines verschlossenen Reaktionsgefäßes) sowie eine geeignete Öffnungsvorrichtung 7 gezeigt. Die Mittel zur Entfernung des Deckels sind hier als konisch geformte Ausnehmung 551 ausgestaltet, welche gegenüber dem Reaktionsgefäß geschlossen, jedoch zur Umgebung hin geöffnet ist, um den Entnahmedorn 700 der Vorrichtung zum Entfernen des Deckels aufnehmen zu können. Gegen die Innenwand 101 des Reaktionsgefäßes drückt hierbei ein Bauteil, welches einen rundum laufenden Dichtungswulst 552 aufweist. Ein besonders vorteilhaftes konstruktives Detail des erfindungsgemäßen Deckels ist die konstruktive Trennung der Mittel 551 von der Dichtungslippe 552 vor, so daß der bei Einführen des Entnahmedorns in den Teil 550 auf die Mittel ausgeübte Druck nicht zu einer wesentlichen Erhöhung des Druckes auf die Dichtlippe führt. Dadurch wird eine starke Erhöhung des festen Sitzes des Deckels bei Einführung des Entnahmedorns 700 vermieden. Die konstruktive Trennung findet in Fig. 2 durch das Vorsehen eines Zwischenraumes 553 zwischen den Mitteln 551 und der Dichtlippe 552 statt. In Fig. 2 ist dieser Zwischenraum in Richtung auf den Innenraum des Reaktionsgefäßes offen. Da die Oberfläche 503 des Deckels im vorliegenden Fall relativ groß ist, ist die Auflagefläche einer Deckelheizung und der Wärmeübergang von der Heizung auf den Deckel besonders groß ist.

In Fig. 3 ist ein besonders vorteilhafter Deckel gezeigt. Er unterscheidet sich im wesentlichen dadurch von dem in Fig. 2 gezeigten Deckel, daß der Zwischenraum 553 nicht in Richtung auf das Reaktionsgefäß, sondern in Richtung auf die Umgebung offen gestaltet ist. Diese Ausführungsform hat den Vorteil, daß die Kontakfläche des Deckels zur Reaktionslösung bzw. dem überstehenden Gasraum klein ist, so daß für eine eventuelle Kondensation von Flüssigkeit an den Deckel nur wenig Oberfläche zur Verfügung steht.

In Fig. 4 ist ein Deckel abgebildet, bei dem kein Zwi-

schenraum 553 vorgesehen ist. Dieser Deckel ist zwar für das erfindungsgemäße System ebenfalls brauchbar, jedoch mit dem Nachteil, daß das Einführen des Entnahmedorns den Druck auf die Reagenzvorratsgefäßinnenwand erhöht und somit eine höhere Kraft zur Entfernung des Deckels von dem Reaktionsgefäß erforderlich wird, als in den oben beschriebenen Fällen.

Die Vorrichtung zum automatischen Öffnen der Verschlüsse ist auf die Form der Mittel zur Entfernung des Deckels im Deckel abgestimmt. Als besonders vorteilhaft haben sich Dorne erwiesen, die einen Entnahmewulst 701 aufweisen, der über einen entsprechenden Widerstand des Deckels in den Teil 550 hineingedrückt werden muß. Beim Zurückziehen des Dorns wirkt der Wulst als Widerstand. Dadurch, daß der Druck des Deckels auf die Reaktionsgefäßinnenwand kleiner ist als der Widerstand des Wulstes mit dem Deckel, wird der Deckel aus dem Reaktionsgefäß entfernt.

Damit der Entnahmedorn 7 mehrfach verwendet werden kann, enthält die Vorrichtung bevorzugterweise auch ein Bauteil zum Abstreifen des vom Reaktionsgefäß entfernten Deckels vom Entnahmedorn. Dies kann beispielsweise eine Abstreiferhülse 702 sein.

Die Vorrichtung ist für die Bearbeitung von Proben in Reaktionsgefäßen auf die Anordnung der Reaktionsgefäße ausgerichtet. Im Falle einer Verwendung einer Verbundplatte befindet sich die Vorrichtung daher an einer X-Y-Transporteinheit, mit der die Vorrichtung über das jeweilige Reaktionsgefäß gefahren werden kann. Durch Bewegung des Entnahmedorns 700 auf die verschlossenen Reaktionsgefäße zu (Z-Richtung), wird die Spitze des Entnahmedorns in den Deckel eingeführt. Diese Bewegung wird im allgemeinen senkrecht zu der Transportebene sein. Obwohl die beiden Bewegungsvorgänge prinzipiell durch jeden computergesteuerten Roboter ausführbar sind, ist es auch möglich, übliche Pipettierautomaten z. B. von Tecan durch Ersatz der üblicherweise verwendeten Zahnstange zum Pipettieren durch eine Zahnstange mit einer Vorrichtung 7, umzurüsten. Es ist auch möglich, die Vorrichtung zum automatischen Öffnen des Deckels zusätzlich zur Pipettiereinheit an einer Zahnstange eines Pipettierautomaten zu befestigen. Der Pipettierautomat wird entsprechend programmiert.

Zur parallelen Bearbeitung mehrerer Reaktionsgefäße, z. B. einer Reihe einer Mikrotitrationsplatte, können mehrere Vorrichtungen 7 an einer Transporteinheit angebracht werden, so daß mehrere Einzeldeckel parallel geöffnet werden können. Diese Ausführungsform erscheint im Hinblick auf die Vermeidung von Kontaminationen jedoch nicht bevorzugt.

Die vorliegende Erfindung, insbesondere der automatengängige Deckel, ist nicht nur für Reaktionsgefäße verwendbar, sondern für jede Art von Gefäßen in einem System zur Durchführung mehrerer Reaktionen. Dazu gehören neben den Gefäßen in denen eine Reaktion zwischen mehreren Reaktionspartnern abläuft, und welche hier Reaktionsgefäße genannt werden, auch Gefäße, in denen die einzelnen Reaktionspartner der gewünschten Reaktion vorgehalten werden. Im Falle der Analytik von flüssigen Proben kann hier zwischen Probengefäßen und Reagenzvorratsgefäßen unterschieden werden. In einem Probengefäß wird eine Flüssigkeit, die auf das Vorhandensein bzw. die Menge eines oder mehrerer Analyten untersucht werden soll, vorgehalten. Die Probenflüssigkeit wird nach Probennahme (z. B. Gewinnung von Blut eines Patienten, der untersucht werden soll) und evtl. Aufarbeitung (Gewinnung von Plasma

oder Serum) in ein Probengefäß überführt und gewünschtenfalls mit einem erfindungsgemäßen automatengängigen Deckel verschlossen. Dann wird das Probengefäß einzeln oder zusammen mit weiteren Probengefäßen in das System, z. B. einen automatischen Analysenautomaten, eingeführt. Zum Ablauf eines erfindungsgemäßen Verfahrens wird, bevor eine Überführung von Probenflüssigkeit aus dem Probengefäß in ein Reaktionsgefäß vorgenommen werden soll, der Deckel vom Probengefäß entfernt und die gewünschte Menge der Probenflüssigkeit entnommen. Ein Vorteil des erfindungsgemäßen Systems, bei dem auch die Probengefäße mittels eines automatengängigen Deckels verschlossen sind, ist die Möglichkeit des einfachen Wiederverschlusses des Probengefäßes mittels des selben oder eines neuen Deckels. Für den bevorzugten Fall des Wiederverschlusses mit einem neuen Deckel wird der alte Deckel vom Entnahmedorn durch die Abstreiferhülse in ein Abfallgefäß überführt und ein neuer Deckel aus einem Vorratsgefäß für Deckel auf den Entnahmedorn aufgezogen. Der neue Deckel wird daraufhin auf das Probengefäß aufgesetzt und der Entnahmedorn entfernt, wobei der Deckel auf dem Probengefäß verbleibt. Für eine weitere Bestimmung eines weiteren Analyten aus der selben Probe wird der Deckel erneut entfernt und wiederum eine bestimmte Menge der Probenflüssigkeit entnommen. Wenn der Deckel ein Septum beinhaltet, kann eine Probenentnahme aus dem Probengefäß auch ohne Entfernen des Deckels mit einer Stechpipette vorgenommen werden.

Bei der Abarbeitung von Reaktionen kann es erforderlich sein, weitere Reagenzien in das Reaktionsgefäß zu überführen. Diese werden in Reagenzvorratsgefäßen vorgehalten, die ebenfalls erfindungsgemäß verschlossen und geöffnet werden können. Unter einem Reagenzvorratsgefäß ist daher ein Vorratsgefäß für Reagenzien zu verstehen, wobei diese Reagenzien bei der Durchführung von Reaktionen in Reaktionsgefäßen verwendet werden. Da die Reagenzien in der Regel in größeren Mengen, z. B. für die Durchführung mehrerer Reaktionen, bereitgehalten werden müssen, haben diese Reagenzvorratsgefäße oft die Form von Flaschen mit Volumina zwischen 20 und 500 ml. Auch solche Reagenzvorratsgefäße können durch einen automatengängigen Deckel gemäß der Erfindung geschlossen sein. Dies wird in der Regel herstellenseitig geschehen. Der Kunde setzt das Reagenzvorratsgefäß in eine geeignete Position des Systems ein. Sobald in einem Reaktionsgefäß eine Reaktion durchgeführt werden soll, welche die Verwendung des in dem bestimmten Reagenzvorratsgefäß vorgehaltenen Reagenzes erfordert, wird der automatengängige Deckel von dem Reagenzvorratsgefäß entfernt und die erforderliche Menge Reagenz entnommen und ins Reaktionsgefäß überführt. Anschließend kann das Reagenzvorratsgefäß durch den abgenommenen oder einen neuen Deckel (siehe Probengefäß) wieder verschlossen werden.

Für den Fall von großvolumigen Reagenzvorratsgefäßen können prinzipiell die bisher verwendeten Reagenzvorratsgefäße weiterverwendet werden, wenn die üblicherweise verwendeten Schraubdeckel durch Einsatz des erfindungsgemäßen automatengängigen Deckels modifiziert werden. Dazu wird bevorzugt in der Oberseite des Schraubdeckels eine kleine Öffnung vorgesehen, welche dann mit einem erfindungsgemäßen Deckel verschlossen wird. Dieses System hat den Vorteil, daß das Reagenzvorratsgefäß durch eine relativ große, durch den Schraubdeckel verschlossene Öffnung

befüllt werden kann, jedoch die Entnahme von Reagenzflüssigkeit durch die relativ kleine, erfindungsgemäß verschlossene Öffnung vorgenommen werden kann.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur automatischen Durchführung von chemischen Reaktionen in Reaktionsgefäßen, gekennzeichnet durch die Schritte:

- Zurverfügungstellen von Reaktionsgemischen in Reagenz- und/oder Reaktionsgefäßen,
- Verschuß der Reaktionsgefäße durch Einzelverschlüsse und
- automatisches Öffnen der Einzelverschlüsse mittels einer Vorrichtung zum Entfernen des Deckels von den Gefäßen.

Das Verfahren läuft prinzipiell ähnlich ab wie die bisher bekannten manuellen Verfahren, jedoch unter Verwendung eines automatengängigen Deckels und in einem System. Selbstverständlich können die automatengängigen Deckel auch manuell geöffnet und verschlossen werden. Zentrales Merkmal ist die Zurverfügungstellung von Reaktionsgefäßen, die eine Reaktionsmischung enthalten und die mittels eines automatengängigen Deckels verschlossen sind. Dies gilt besonders für Reaktionen, welche in Thermozyklen verlaufen. Nach Beendigung der Reaktion wird der Deckel mit Hilfe einer Vorrichtung zum Entfernen des Deckels vom Reaktionsgefäß gelöst. Dies geschieht durch Einführen der Vorrichtung in die im Deckel vorgesehenen Mittel und Herausziehen der Vorrichtung mitsamt dem Deckel. Der Deckel kann anschließend durch Zurückziehen des Entnahmedorns in eine Abstreiferhülse vom Entnahmedorn abgestreift werden. Danach kann die Reaktionsmischung aus dem Reaktionsgefäß entnommen oder darin weiterverarbeitet und gewünschtenfalls sogar wieder mittels eines (neuen) Deckels verschlossen werden.

Vorteil des erfindungsgemäßen Deckels ist die Verwendbarkeit einer Deckelheizung aufgrund der besonders einfachen Möglichkeit, eine flache Oberfläche vorzusehen.

Durch die Verlagerung der Mittel zum Öffnen des Deckels in den Raum unterhalb des Gefäßes wird Material gespart und eine kompakte Bauweise ermöglicht. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit, den Gasraum über der Reaktionslösung durch die in das Reaktionsgefäß hineinragenden Teile des Deckels so klein wie möglich zu halten. Dieser Vorteil hat zur Folge, daß die Höhe der Wandungen des Reaktionsgefäßes nicht verringert werden muß, was im Hinblick auf Spritzmöglichkeiten bei Pipettiervorgängen nachteilig wäre. Die Automatengängigkeit des erfindungsgemäßen Deckels erleichtert die Vollautomatisierbarkeit von Systemen zum Nachweis von Analyten in Flüssigkeiten.

Die Erfindung kann insbesondere für die Analyse von Bestandteilen von Körperflüssigkeiten nach Prinzip von Immunoassays oder Nukleinsäurediagnostik angewendet werden. Wegen der oben genannten Vorteile ist die Anwendung beim Nachweis von Nukleinsäuren besonders bevorzugt. Nachweisverfahren für Nukleinsäuren können als Schritte zur Bearbeitung die Amplifikation von Nukleinsäuren in einer Flüssigkeit, z. B. nach Art der Polymerasekettenreaktion (EP-B-0 200 362) oder eines anderen Systems beinhalten. Auch die Durchführung von daran angeschlossenen Hybridisierungsreaktionen mit Nachweissonden kann in den erfindungsgemäßen Reaktionsgefäßen durchgeführt werden. Hierbei

ist auch die mehrfache Öffnung des Reaktionsgefäßes mit Hilfe eines erfindungsgemäßen Deckels möglich.

In Fig. 1 ist eine Verbundplatte mit Reaktionsgefäß 1, Thermoblock 4 und erfindungsgemäßem Deckel gezeigt.

In Fig. 2 bis 4 sind Deckel zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens in Zusammenschau mit geeigneter Entnahmevorrichtung und Reaktionsgefäß gezeigt.

In Fig. 5 ist ein erfindungsgemäßes System zur Durchführung von Reaktionen gezeigt. Dabei ist eine Verbundplatte mit Reaktionsgefäßen und Deckeln mit Bezugszeichen 010 angedeutet. Es können Reagenzvorratsbehälter 011, 012 und 013 sowie mehrere Probenprimärgefäße 014, 015 und 016 vorgesehen sein, aus denen die für die Reaktion erforderlichen Mengen von der Pipettiereinheit 017 entnommen und in die Reaktionsgefäße 5 pipettiert werden. Nach Verschuß der Reaktionsgefäße, der gewünschtenfalls ebenfalls mit der Entnahmevorrichtung 7 vorgenommen werden kann, Reaktion und Öffnen des Deckels mit der Entnahmevorrichtung, können weitere Reagenzien zupipettiert werden. Gewünschtenfalls wird dann eine Messung von Signalen entweder im Reaktionsgefäß selbst oder nach Entfernen der Reaktionsmischung in eine Messeinheit vorgenommen. In der Figur ist die Zahnstange 018 der XYZ-Transporteinheit eines üblichen Pipettierautomaten (z. B. der Firma Tecan) angedeutet.

Die erwähnte Kontaminationsgefahr kann sich auch auf Reagenzien beziehen, die offen auf einem Gerät stehen. Fig. 6 zeigt eine erfindungsgemäße Ausführung eines Schraubdeckels, der sich mit gängigen Maschinen in der Produktion verarbeiten läßt und anschließend systemgänglich ist. Der Schraubdeckel 8 weist ein Schraubgewinde 801 und eine Entnahmeöffnung 802 auf, welche mit Hilfe eines erfindungsgemäßen Deckels verschlossen oder geöffnet werden kann.

Analog gilt für die Proben, die in eine Ausführungsform mit Septum direkt nach Blutentnahme in ein spezielles Probenröhrchen mittels Spritze überführt werden können. In Fig. 7 ist hierzu ein modifizierter erfindungsgemäßer Deckel gezeigt. Er weist ein Septum 555 auf, welches mittels einer üblichen Pipettennadel durchstoßen werden kann. Der Vorteil dieser Ausführungsform ist die Möglichkeit einer mehrfachen Probenentnahme, ohne daß der erfindungsgemäße Deckel entfernt werden muß. Das Septum befindet sich bevorzugt in dem in das Probengefäß hineinragenden Teil des Deckels.

In Fig. 8 ist eine Rasteinheit für eine Entnahmevorrichtung gezeigt. Diese wird über ein Druckstück 2101 bedient, welches zusammen mit dem Rastelement 2103 durch eine Abdrückfeder 2106 um einen Druckstift 2105 in einer Ausgangsstellung gehalten wird. Das Rastelement 2103 läuft hierbei in einer Rasthülse 2102 und der Druckstift 2105 in einer Abdrückhülse 2104.

Diese Rasteinheit kann sowohl manuell als auch innerhalb eines Systems zur Entnahme von Deckeln verwendet werden. Bevorzugt ist das Rastelement in einer äußeren Hülse 2002 gehaltert, welche in Fig. 9 gezeigt ist. Die Rasteinheit mit dem Bezugszeichen 2100 gekennzeichnet.

In Fig. 10 ist ein manuelles Entnahmeggerät gezeigt.

In Fig. 11 sind Stufen A bis F zur Entfernung eines Deckels von einem Gefäß gezeigt. Stufe A zeigt die Ausgangsstellung des Entnahmeteils und ein mittels eines erfindungsgemäßen Deckels verschlossenes Gefäß. In Stufe B wird das Entnahmeelement auf die Bauein-



heit, welche das Gefäß enthält, aufgesetzt. In Stufe C wird der Entnahmedorn in den Teil 550 des Deckels eingeführt. Durch Zurückziehen des Entnahmedorns um eine kurze Wegstrecke, rastet der Entnahmedorn an der vorgesehenen Engstelle ein (Stufe D). Durch weiteres Zurückziehen des Entnahmedorns zusammen mit der Abstreifhülse wird der Deckel von dem Gefäß entfernt (Stufe E). In Stufe F wird die Entnahmeeinheit von der Baueinheit mit dem Reaktionsgefäß abgehoben. In einer nicht gezeigten weiteren Stufe G wird der Deckel durch Vorschieben der Abstreifhülse über den Entnahmewulst hinaus abgestreift. Danach steht die Entnahmeeinheit wieder in Ausgangsstellung oder kann in die Ausgangsstellung (Stufe A) zurücküberführt werden.

#### Bezugszeichenliste

1 Reaktionsgefäß	
101 Innenwand des Reaktionsgefäßes	20
102 Widerhaken	
2 Halteplatte	
3 Löcher in der Halteplatte	
4 Thermoblock	
5 Deckel	25
500 Aus dem Reaktionsgefäß hinausragender Teil des Reaktionsgefäßes	
501 Anschlag	
503 Oberfläche des Deckels	
550 In die Öffnung des Reaktionsgefäßes hineinragender Teil	30
551 Mittel zur Entfernung des Deckels	
552 Dichtwulst	
553 Zwischenraum	
554 Auf die Innenwand 101 gerichtete Außenoberfläche des Deckels	35
555 Septum	
7 Öffnungsvorrichtung/Entnahmevorrichtung	
700 Entnahmedorn	
701 Entnahmewulst	40
710 Abstreifhülse	
2100 Entnahmevorrichtung	
2101 Druckstück	
2102 Rasthülse	
2103 Rastelement	45
2105 Druckstift	
2106 Abdrückfeder	
2001 Aufnahme	
2002 Hülse	
2003 Gegenhalter	50
2004 Rastfeder	
2005 Kreuzschlitzschraube	
010 Verbundplatte mit Reaktionsgefäßen und Deckeln	
011, 012, 013 Reagenzvorratsgefäße	
014, 015, 016 Probengefäße	55
017 Pipettiereinheit	
018 Zahnstange	
8 Schraubdeckel	
801 Schraubgewinde	
802 Entnahmeöffnung des Schraubdeckels.	60

#### Patentansprüche

1. System zur automatischen Durchführung von Reaktionen in Reaktionsgefäßen, enthaltend:
  - mehrere Reaktionsgefäße,
  - mehrere Reagenzvorratsgefäße,
  - mehrere Probengefäße,

- Einzelverschlüsse für mehrere dieser Gefäße und
- eine Vorrichtung zum automatischen Öffnen der Einzelverschlüsse.

2. System gemäß Anspruch 1, weiterhin enthaltend eine automatische Pipettiereinrichtung.

3. System gemäß Anspruch 1 oder 2, weiterhin enthaltend eine Einrichtung zur Regulierung der Temperatur von in den Reaktionsgefäßen enthaltenden Flüssigkeiten.

4. Deckel für ein Gefäß, welcher einen in eine Öffnung des Gefäßes hineinragenden Teil aufweist, dadurch gekennzeichnet, daß der hineinragende Teil Mittel zur Entfernung des Deckels von dem Gefäß aufweist.

5. Deckel gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Deckel einen Dichtwulst zum Verschließen des Zwischenraums zwischen Deckel und Gefäß aufweist.

6. Deckel gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen den Mitteln zur Entfernung des Deckels und dem Dichtwulst ein Zwischenraum vorgesehen ist.

7. Deckel gemäß einem der Ansprüche 4 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß der herausragende Teil eine flache Oberfläche aufweist.

8. Deckel gemäß Anspruch 4 für ein Reaktionsgefäß.

9. Deckel gemäß Anspruch 4 für ein Reagenzvorratsgefäß.

10. Deckel gemäß Anspruch 9, wobei das Reagenzvorratsgefäß mittels eines Schraubverschlusses verschlossen ist.

11. Deckel gemäß Anspruch 4 für ein Probengefäß.

12. Verfahren zur automatischen Durchführung chemischer Reaktionen in mehreren Reaktionsgefäßen, gekennzeichnet durch die Schritte

- Zur Verfügungstellen von Reaktionsmischungen in Reaktionsgefäßen,

- Verschluß der Reaktionsgefäße durch Einzelverschlüsse und

- automatisches Öffnen der Einzelverschlüsse mittels einer Vorrichtung zur Entfernung der Verschlüsse von den Reaktionsgefäßen.

13. Verfahren zur automatischen Durchführung chemischer Reaktionen mit Hilfe mehrerer Reagenzvorratsgefäße, gekennzeichnet durch die Schritte

- Zur Verfügungstellen von Reagenzflüssigkeiten in Reagenzvorratsgefäßen, die durch Einzelverschlüsse verschlossen sind und

- automatisches Öffnen eines Einzelverschlusses mittels einer Vorrichtung zur Entfernung der Verschlüsse von den Reagenzvorratsgefäßen,

- Entnahme von Reagenzflüssigkeit,

- automatischer Wiederverschluß des Reagenzvorratsgefäßes durch einen Einzelverschluß.

14. Verfahren zur automatischen Durchführung chemischer Analysen in Probenflüssigkeiten aus mehreren Probengefäßen, gekennzeichnet durch die Schritte

- Zur Verfügungstellen von Probenflüssigkeiten in Probengefäßen, welche durch Einzelverschlüsse verschlossen sind und

- automatisches Öffnen eines Einzelverschlusses mittels einer Vorrichtung zur Entfer-



nung des Verschlusses von einem Probenge-  
faß.

Hierzu 9 Seite(n) Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG 1

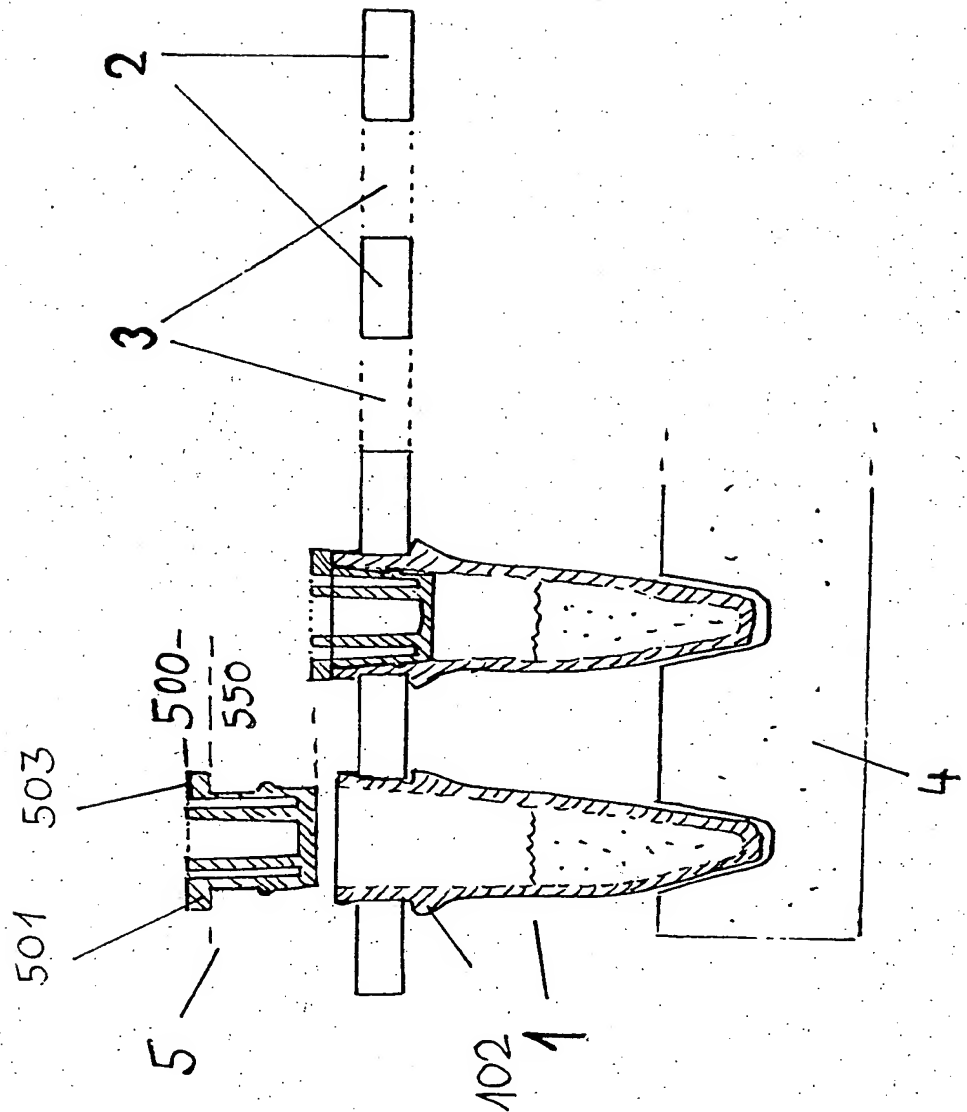


FIG 2

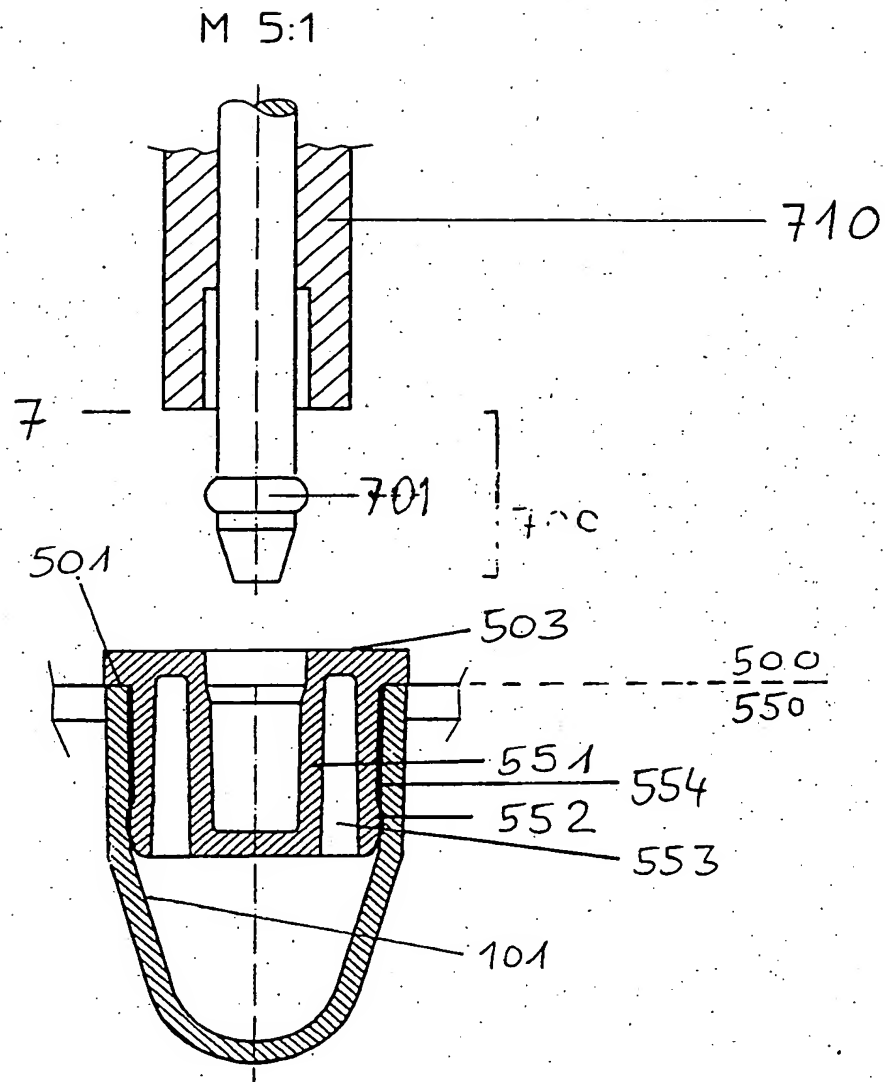


FIG 3

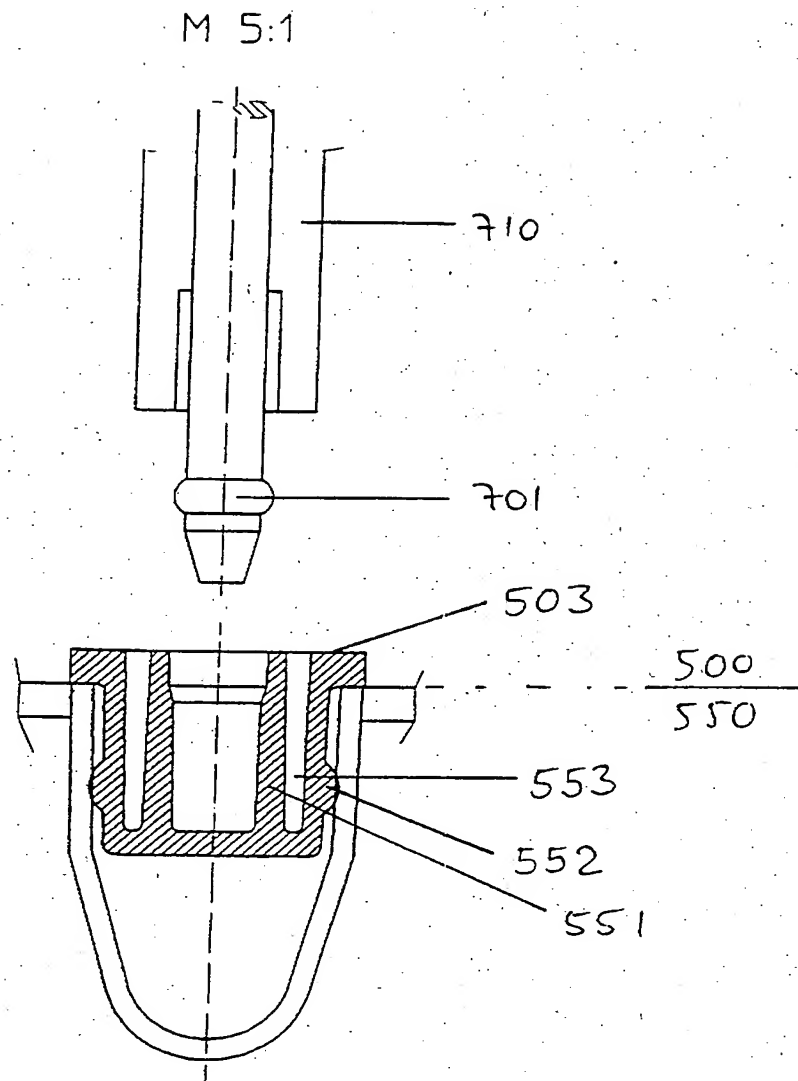


FIG 4

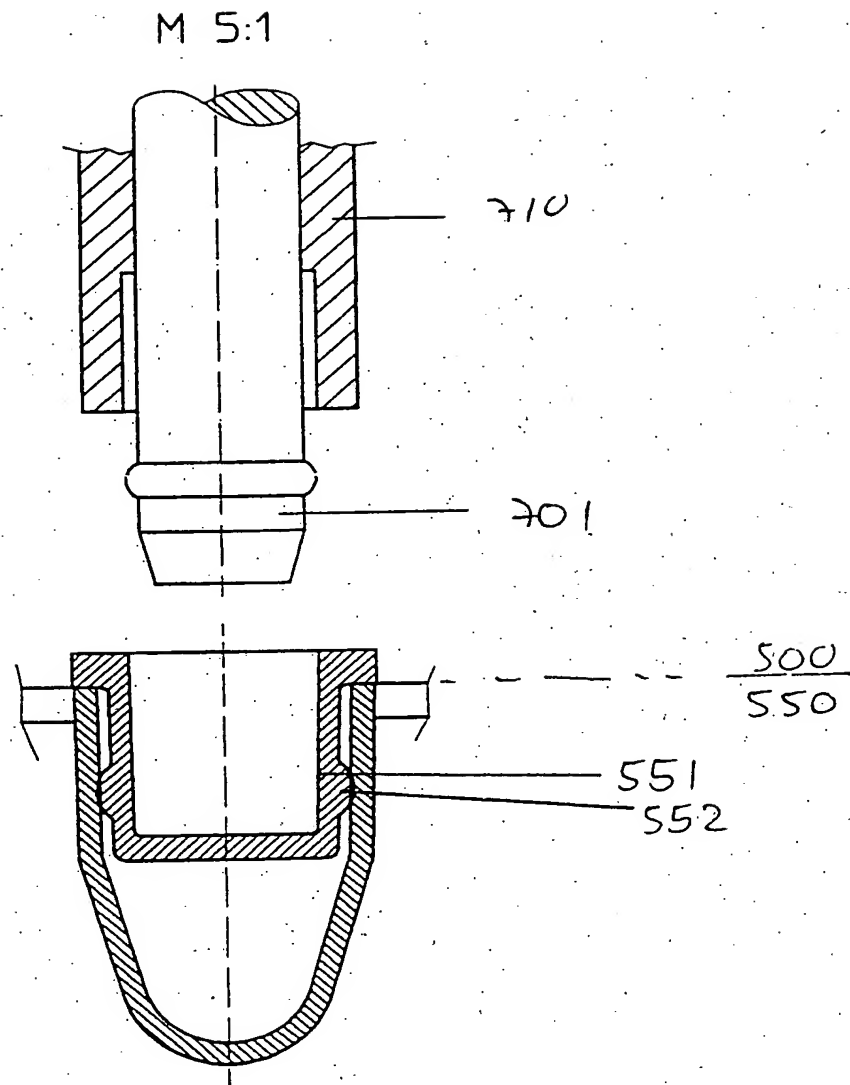


FIG 5

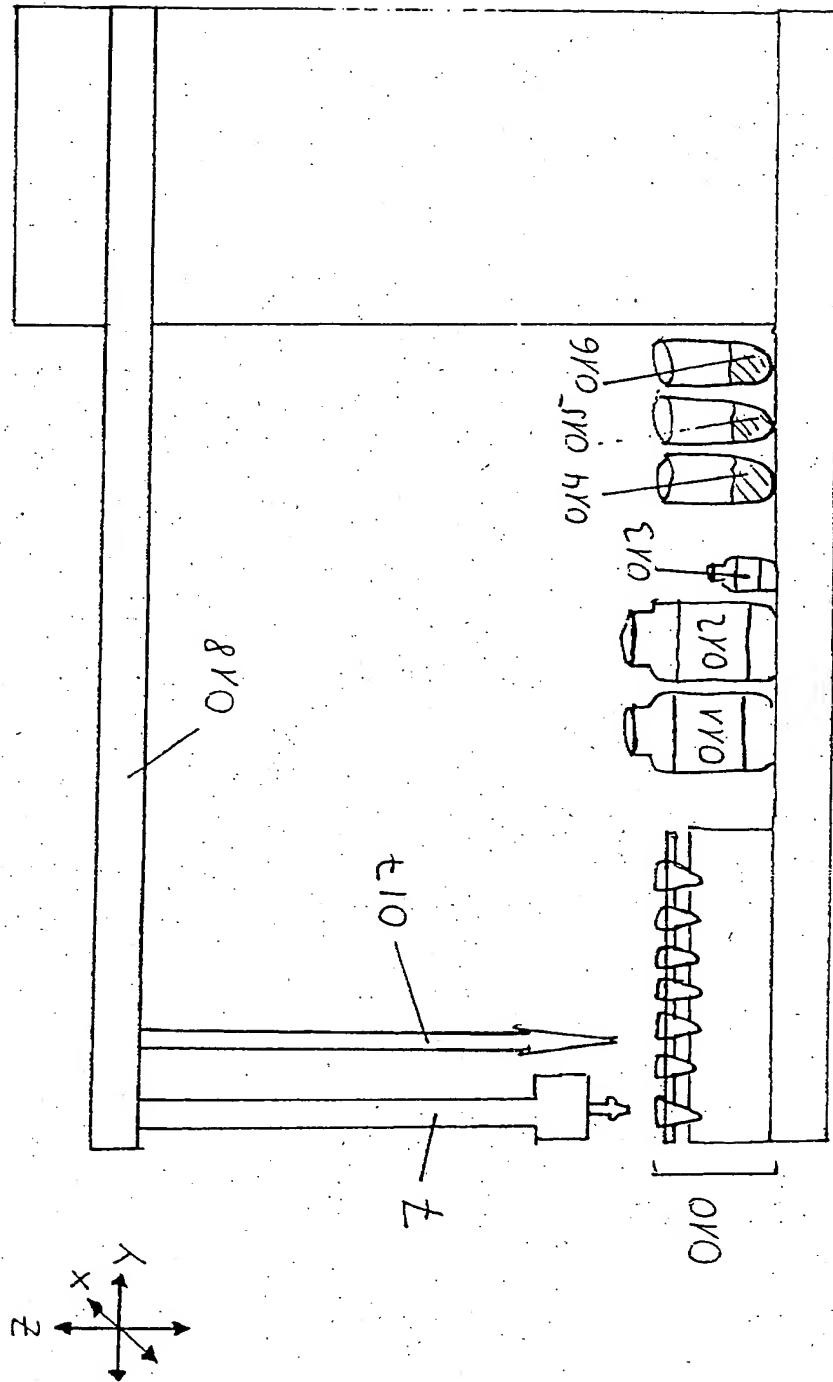


FIG 6

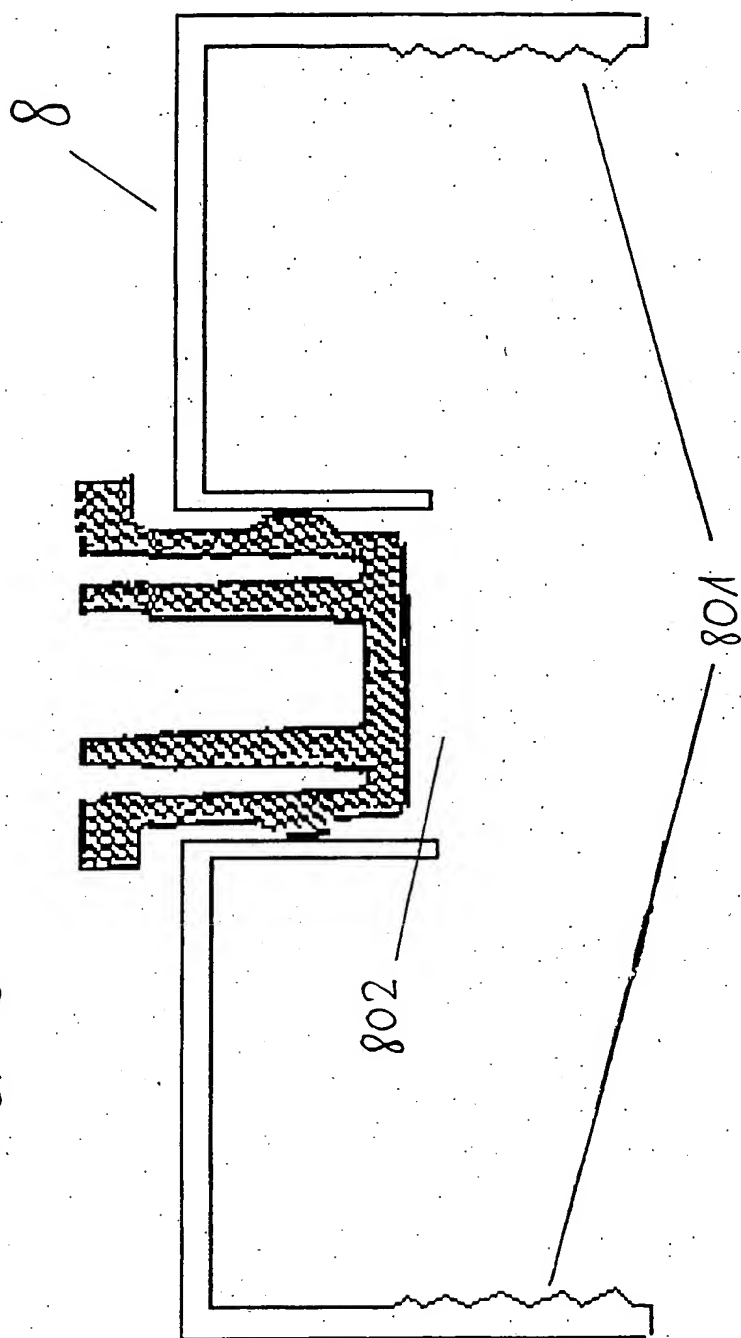
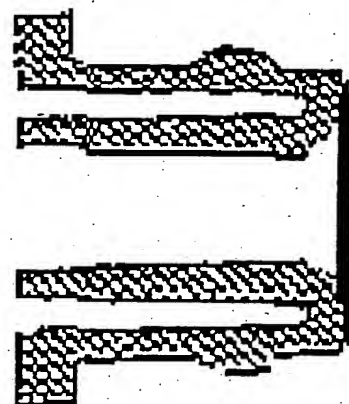


FIG 7





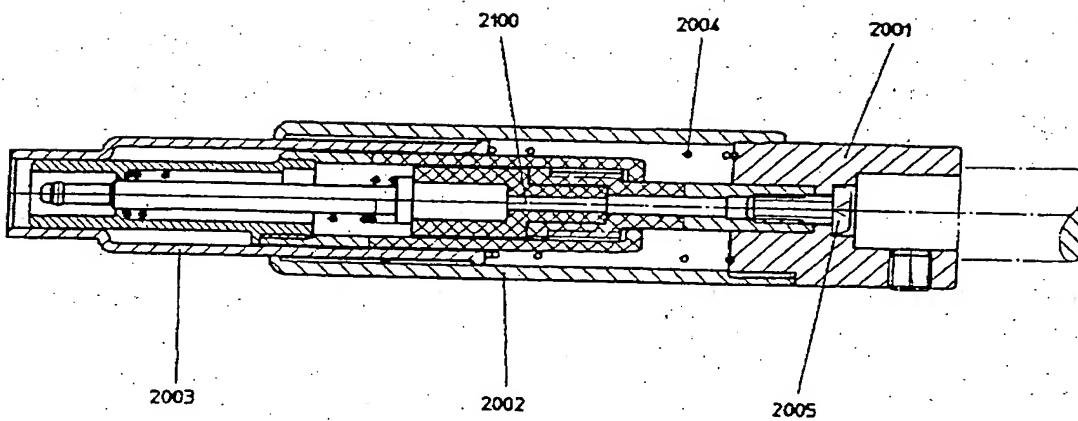
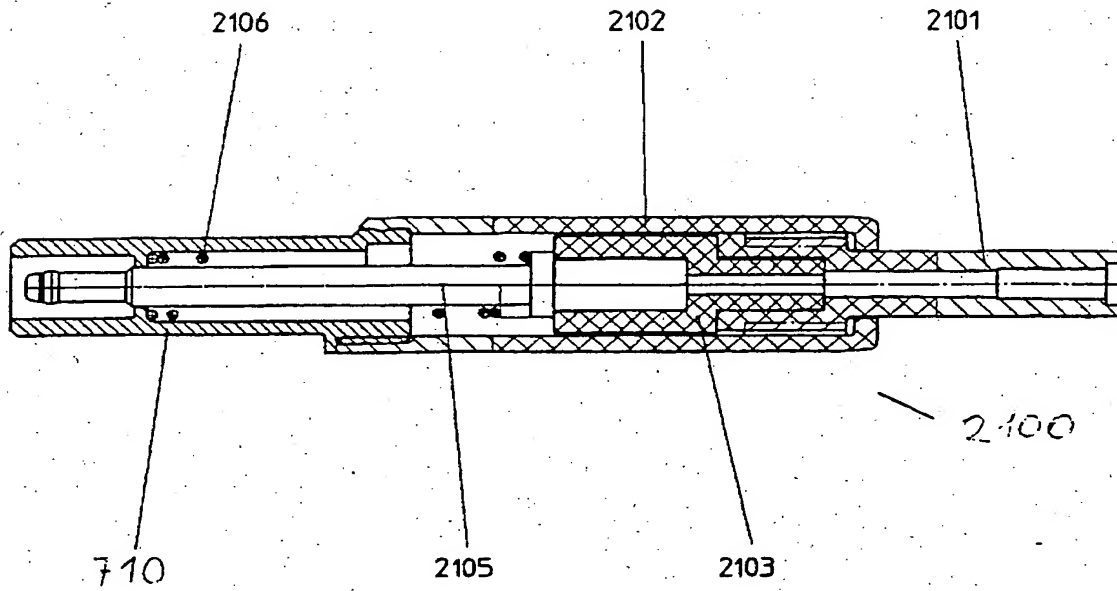


FIG 10

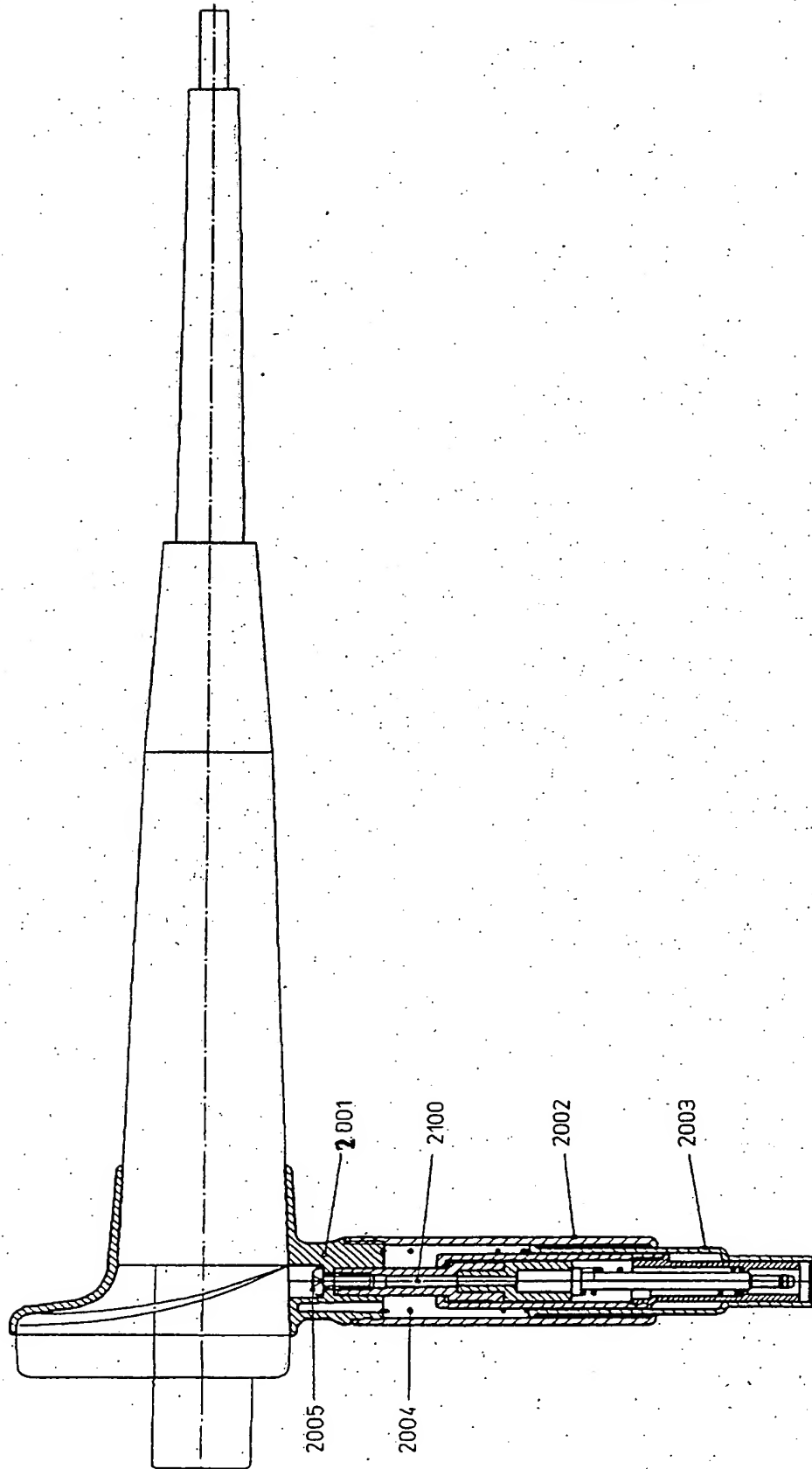


FIG 11

